

1280

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
28. Dezember 2000 (28.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/78933 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 9/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/05261

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. Juni 2000 (07.06.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 28 021.5 18. Juni 1999 (18.06.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];
D-67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DEAR, Neil, T.
[AU/DE]; Wundstrasse 31, D-69123 Heidelberg (DE).
BÖHM, Thomas [DE/DE]; Freiburgerstrasse 30, D-79279
Vörstetten (DE). MÖLLER, Achim [DE/DE]; Im Zaun-
rücken 10, D-67269 Grünstadt (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGE-
SELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

WO 00/78933 A2

(54) Title: NOVEL CALPAINS AND THEIR USE

(54) Bezeichnung: NEUE CALPAINE UND DEREN VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to novel calpains and their use.

(57) Zusammenfassung: Neue Calpaine und deren Verwendung.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Neue Calpaine und deren Verwendung

Die Erfindung betrifft ein neues Säugetier-Calpain CAPN11, seine
5 Synthese sowie seine Verwendung.

Calpaine sind eine Superfamilie verwandter Proteine, von denen
einige nachgewiesenermaßen als calciumabhängige Cysteinproteasen
wirken. In Säugetieren sind acht verschiedene Calpaine identifi-
10 ziert worden.

Calpaine bilden eine Familie intrazellulärer calciumabhängiger
Cystein-Proteasen. Man hat eine steigende Zahl von Säugetier-Cal-
pain-Homologa identifiziert, und die einzelnen Mitglieder lassen
15 sich auf der Basis der physikalischen Struktur und der vorherge-
sagten Eigenschaften in vier Klassen einteilen. Die Klasse A, die
"klassischen Calpaine" CAPN1, CAPN2, CAPN3 (p94); CAPN8 (nCL-2)
und CAPN9 (nCL-4) sind wahrscheinlich alle proteaseaktiv und
Ca²⁺-abhängig. Sie bestehen aus einer variablen großen (80 kDa)
20 und einer invarianten kleinen Untereinheit (30 kDa). Die Calpaine
der Klasse B und D, CAPN5 (6,15) und CAPN7 (8) sind proteaseak-
tiv, jedoch höchstwahrscheinlich Ca²⁺-unabhängig, das Calpain der
Klasse C, CAPN6, besitzt wahrscheinlich keine Proteaseaktivität.
Die Calpaine lassen sich auch auf der Basis ihrer Expressionsmu-
25 ster in Kategorien einteilen, wobei CAPN3, CAPN6, CAPN8 und CAPN9
etwas Gewebespezifität aufweisen. Die Funktion der Calpaine ist
nicht bekannt, obwohl sie mit sehr vielen physiologischen Prozes-
sen und pathologischen Zuständen in Verbindung gebracht wurden
(Überblick in Literaturstelle 17). Zur Aufklärung ihrer Funktion
30 und Evolutionsgeschichte ist die Identifizierung des gesamten
Spektrums der Calpain-Familienmitglieder notwendig.

Die Erfindung betrifft das neue Polypeptid CAPN11 mit der in SEQ.-
ID.-Nr. 2 offenbarten Aminosäuresequenz.

35

Das neue Calpain-Protein CAPN11 besitzt die für Calpaine typi-
schen Eigenschaften, einschließlich potentieller Protease- und
Calciumbindungs-Domänen. Es weist eine stark eingeschränkte Gewe-
beverteilung auf und wird hauptsächlich im Hoden exprimiert. Mit
40 Hilfe der Strahlungs-Hybrid-Kartierung wurde das Gen auf Chromo-
som 6 in einer Region lokalisiert, die p12 zugeordnet wird. Aus
phylogenetischer Analyse geht hervor, daß CAPN11 in Säugetieren
am engsten mit CAPN1 und CAPN2 verwandt ist.

45 Die vorhergesagte CAPN11-Sequenz weist jedoch von den verfügbaren
Calpainsequenzen die größte Homologie zum Küken-Calpain μ /m auf.
Somit kann CAPN11 das menschliche Orthologon des μ /m-Calpains

sein. Die Entdeckung dieses neuen Calpains betont die Komplexität der Calpain-Familie, deren Mitglieder sich auf der Basis der Proteaseaktivität, Calciumabhängigkeit und Gewebeexpression unterscheiden lassen.

5

Die cDNA-Nukleotidsequenz des CAPN11-Gens enthält 2338 Nukleotide (SEQ.-ID.-Nr. 1). Die cDNA-Sequenz stammt von einer einzigen mRNA durch erfolgreiche Amplifizierung der gesamten mutmaßlichen codierenden Region aus menschlicher Hoden-cDNA mittels flankierender Primer. Mehrere cDNA-Klone wurden vollständig sequenziert, um jedwede PCR-Artefakte auszuschließen.

Es gibt ein großes offenes Leseraster, das ein Protein mit 702 Aminosäuren codiert (Mr 80 kDa) (Fig. 1). Die Aminosäuresequenz ähnelt der großen Untereinheit von Mitgliedern der Calpain-Familie (Fig. 1). Das Protein läßt sich in die vier für Calpain typischen Domänen unterteilen. Die Domäne II weist die Eigenschaften einer Protease-Domäne auf, und die vorhergesagte Aminosäuresequenz besitzt die drei Aminosäurereste (Cys102, His259 und Asn283), die Teil des aktiven Zentrums von Cysteinproteasen sind (2). Die Aminosäuresequenz sämtlicher fünf, für CAPN2 beschriebenen Ca²⁺-bindenden Sequenzen (4, 12) sind in gewissem Ausmaß konserviert (Fig. 1). Dieses Protein besitzt somit wahrscheinlich Protease- und Calciumbindungs-Eigenschaften. Ein Vergleich der vorhergesagten Aminosäuresequenz mit denen sämtlicher anderer Calpaine ergab die größte Sequenzhomologie (57,5%) zum Küken-Calpain μ /m. Bei den Säugetier-Calpainen bestand die größte Ähnlichkeit zum menschlichen CAPN1 (54,3% Homologie). Das am wenigsten ähnliche menschliche Calpain mit nur 18,7% Homologie war CAPN6. Das dieser cDNA entsprechende Gen wurde vom Human Gene Nomenclature Committee als CAPN11 bezeichnet.

Die vollständige Aminosäuresequenz sämtlicher identifizierter menschlicher Calpaine wurde phylogenetisch analysiert. Die Ergebnisse ermöglichen die Klassifizierung der menschlichen Calpaine in vier Haupt-Evolutionsgruppen (Fig. 2). Die erste Gruppe wird durch CAPN5, CAPN6, CAPN7 und CAPN8 vertreten, die zweite durch CAPN1 und CAPN2, die dritte Gruppe durch CAPN3 und CAPN9, und die vierte umfaßt CAPN11. Die phylogenetische Analyse legt somit nahe, daß CAPN11 eine eigene Calpain-Subfamilie darstellt.

Die Expression von CAPN11 in menschlichen Geweben wurde durch Northern- und RNA-Dot-Blot-Analyse untersucht. Von den 50 untersuchten Gewebe-RNAs wurde die CAPN11-mRNA am stärksten im Hoden exprimiert (Fig. 3A). Die Spezifität dieses Signals wurde durch Northern-Blot-Analyse bestätigt und entsprach einer etwa 3 kb großen mRNA (Fig. 3D). Im Thymus und in der Brustdrüse wurden

viel schwächere Signale nachgewiesen. Die Signifikanz dieses Befundes ist jedoch unklar, da eine weitere Untersuchung von Thymus-RNA mit Northern-Blot-Analyse trotz langer Expositionszeiten kein Signal ergab (Fig. 3D und Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung wäre, daß dieses schwache Signal auf eine Kreuzhybridisierung mit verwandten mRNAs zurückzuführen ist. Somit ist der Hoden die Haupt-Expressionsstelle von CAPN11, obwohl wir die Möglichkeit nicht ausschließen können, daß das Gen in anderen, nicht untersuchten Geweben exprimiert wird.

10

Wir haben bestimmt, auf welchem Chromosom das menschliche CAPN11-Gen lokalisiert ist. Mittels PCR mit Primern, die spezifisch für die menschliche CAPN11-Nukleotidsequenz sind, haben wir mit einem somatischen Mensch/Nagetier-Zellhybrid-Kartierungspanel das Gen dem Chromosom 6 zugeordnet (Correll Cell Repositories). Mit Hilfe der Strahlungs-Hybridkartierung mit dem Stanford-G3-Panel mittlerer Auflösung (Research Genetics Inc.) und der Datenbank am Stanford Human Genome Center (shgc-www.stanford.edu) wurde das Gen 5 Centiray vom Marker SHGC-32834 entfernt auf diesem Chromosom lokalisiert (LOD-Score 12,87). Dieser Marker befindet sich im Zwischenraum zwischen den Mikrosatelliten-Markern D6S1616 (59,6 cM) und D6S427 (73,9 cM) (7), und ein Marker in diesem Zwischenraum, D6S269, ist cytogenetisch 6p12 zugeordnet worden (5). Somit befindet sich CAPN11 auf Chromosom 6 in der Nähe von p12. Auf diesem Chromosom ist kein anderes Calpain-Gen lokalisiert worden.

Das Küken- μ /m-Calpain war das erste Mitglied der zu klonierenden Calpain-Familie (16). Es wurde ursprünglich als m-Calpain bezeichnet, jedoch umklassifiziert, nachdem andere Küken-Calpaine identifiziert wurden, die sehr wahrscheinlich zu den μ - und m-Calpainen aus Säugetier ortholog sind (18). Ein Säugetier- μ /m-Calpain muß jedoch noch bestimmt werden. Da aber CAPN11 eine größere Homologie zum Küken- μ /m-Calpain aufweist als zu anderen Säugetier-Calpainen, kann es sich dabei um dessen Orthologon handeln.

Es gibt bisher 5 Calpaine, die einen gewissen Grad von Gewebespezifität aufweisen - CAPN3 (Skelettmuskel), CAPN6 (Plazenta), CAPN8 (möglicherweise glatte Muskeln), CAPN9 (Magen und Dünndarm) und CAPN11 (Hoden). Man hat zahlreiche Proteasen im Hoden identifiziert, und es wird angenommen, daß sie an Prozessen beteiligt sind, wie Gewebereorganisation (20), Regulation der Spermatogenese (14), Durchdringung der Zona pellucida durch Sperma (10) und Fruchtbarkeit (13). Viele dieser Aktivitäten sind jedoch von sezernierten Proteasen abhängig, und CAPN11 ist wahrscheinlich intrazellulär lokalisiert. Im Hoden könnte es an Prozessen betei-

ligt sein, an denen Calpaine in anderen Geweben beteiligt sind, wie Keimzellen-Apoptose (3) oder Regulation von hodenspezifischen Transkriptionsfaktoren.

- 5 Ein weiterer Aspekt dieser Erfindung betrifft die Verwendung des Polypeptides CAPN11 zur Identifizierung von Substanzen, die die enzymatische Aktivität dieses Polypeptides hemmen können, sogenannte Calpain-Inhibitoren, insbesondere solche Calpain-Inhibitoren, die für CAPN11 selektiv sind. Selektivität bedeutet, daß
- 10 solche Calpain-Inhibitoren die Aktivität von CAPN11 stärker hemmen als die Aktivität der anderen vorstehend genannten Calpaine, und zwar vorzugsweise mindestens 10mal, stärker bevorzugt 25mal stärker. Die Enzymaktivität von CAPN11 ist eine Ca-abhängige Proteaseaktivität.
- 15 Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen, die die Enzymaktivität eines Polypeptides nach Anspruch 1 hemmen, umfassend:
- 20 (a) das Vergleichen des Ausmaßes der enzymatischen Aktivität von CAPN11 in Gegenwart der Verbindung mit dem Ausmaß der enzymatischen Aktivität von CAPN11 in Abwesenheit der Verbindung und
- 25 (b) das Auswählen von Verbindungen, die das Ausmaß der enzymatischen Aktivität von CAPN11 gegenüber der enzymatischen Aktivität von CAPN11 in Abwesenheit der Verbindung ändern.

Die durch das vorstehend erwähnte Verfahren identifizierten hem-

30 menden Verbindungen eignen sich zur Behandlung von Erkrankungen, die mit einer unphysiologisch erhöhten CAPN11-Aktivität einhergehen oder damit verknüpft sind, wie Unfruchtbarkeit bei Männern.

Die Dosierung und das Behandlungsschema dieser Inhibitoren müssen

35 durch Routineverfahren bestimmt werden, die von anderen Proteaseinhibitoren bekannt sind.

LITERATUR

- 40 1. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment sequencing tool. J Mol. Biol. 215:403-410.
2. Berti, P. J und Storer, A. C. (1995). Alignment/Phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. J. Mol. Biol.
- 45 246: 273-283.

3. Billig, H., Chun S.Y., Eisenhauer K. und Hsueh, A.J. (1996). Gonadal cell apoptosis. hormone-regulated cell demise. Hum. Reprod. Update 2:103-117.
4. Blanchard, H., Grochulski, P., Li, Y., Arthur, J.S.C., Davies, P.L., Elce, J.S. und Cygler, M. (1997). Structure of a Ca^{2+} -binding domain reveals a novel EF-hand and Ca^{2+} -induced conformational changes. Nature structural Biology 4: 532-538.
5. Bray-Ward, P., Menninger, J., Lieman, T., Desai, T., Mokady, N., Banks, A. und Ward, D.C. (1996). Integration of the cytogenetic, genetic and physical maps of the human genome by FISH mapping of CEPH YAC clones. Genomics 32: 1-14.
6. Dear, N., Matena, K., Vingron, M. und Boehm, T. (1997). A new subfamily of vertebrate calpains lacking a calmodulin-like domain: Implications for calpain regulation and evolution. Genomics 45:175-184.
7. Deloukas, P. et al. (1998). A physical map of 30,000 human genes. Science 282: 744-746.
8. Franz, T., Vingron, N., Boehm, T. und Dear, T.N. (1999). Capn7: A highly divergent vertebrate calpain with a novel C-terminal domain. Mamm. Genome, im Druck.
9. Frohman, M. A., Dush, M. K. und Martin, G. R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998-9002.
10. Kohnno, N., Yamagata, K., Yamada, S., Kasiwabara, S., Sakai, Y. und Baba, T. (1998). Two novel testicular serine proteases, TESP1 and TESP2, are present in the mouse sperm. acrosome. Biochem. Biophys. Res. Commun. 245:658-665.
11. Kozak, M. (1996). Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. Mamm. Genome 7: 563-574.
12. Lin, G.-D., Chattopadhyay, D., Maki, M., Wang, K.K.W., Carson, M., Jin, L., Yuen, P.-W., Takano, E., Hatanaka, M., DeLucas, L.J. und Narayana, S.V.L. (1997). Crystal structure of calcium bound domain VI of calpain at 1.9 Å resolution and its role in enzyme assembly, regulation, and inhibitor binding. Nature Structural Biology 4: 539-547.
13. Mbikay, M., Tadros, H., Ishida, N., Lerner, C.P., De Lami-rande, E., Chen, A., El-Alfy, M., Clermont, Y., Seidah, N.G., Chrétien, N., Gagnon, C. und Simpson, E.M. (1997). Impaired fertility in mice deficient for the testicular germ-cell protease PC4. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:6842-6846.
14. Monsees, T.K., Gornig, N., Schill, W.B. und Miska, W. (1998). Possible involvement of proteases in the regulation of spermatogenesis. Andrologia 30:185-191.

15. Mugita, N., Kimura, Y., Ogawa, M., Saya, H. und Nakao, M. (1997), Identification of a novel, tissue-specific calpain htra-3; a human homologue of the *Caenorhabditis elegans* sex determination gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 239:845-850.
16. Ohno, S., Emori, Y., Imajoh, S., Kawasaki, H., Kisaragi, M. und Suzuki, K. (1984). Evolutionary origin of a calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein? *Nature* 312: 566-570.
17. Ono, Y., Sorimachi, H. und Suzuki, K. (1998). Structure and physiology of calpain, an enigmatic protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245:289-294.
18. Sorimachi, H., Tsukahara, T., Okada-Ban, M., Sugita, H., Ishiura, S. und Suzuki, K. (1995). Identification of a third ubiquitous calpain species - chicken muscle expresses four distinct calpains. *Biochim. Biophys. Acta* 1261: 381-393.
19. Thompson J.D., Higgins D.G. und Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22 :4673-4680.
20. Tohonon, V., Osterlund, C. und Nordqvist, K. (1998). Testatin: A cystatin-related gene expressed during early testis development. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 95:14208-14213.

25

FIGUREN

FIG. 1. Gruppierung der vorhergesagten Aminosäuresequenz von CAPN11 mit anderen menschlichen Calpainen. Die Mehrfach-Gruppierung der Aminosäuresequenzen wurde mittels CLUSTAL W (19) durchgeführt. Das mutmaßliche Start-Methionin für CAPN11 (GGAatgG) entspricht der minimalen Konsensussequenz für die Translationsstartstelle (RNNatgG, wobei R ein Purin ist, Lit. 11). Aminosäuren, die in den anderen Proteinen mit denen von CAPN11 identisch sind, sind schattiert. Striche bedeuten Lücken, die zur Maximierung des Alignments eingefügt worden sind. Pfeilspitzen deuten auf die drei konservierten Aminosäuren hin, die Teil des aktiven Zentrums der Calpaine sind. Die potentiellen EF-Hand-Calcium-Bindungsdomänen von CAPN8 sind unterstrichen und nacheinander durchnummeriert. Es sind die willkürlichen Domänen von Calpain angegeben. Die Sequenzen für CAPN4 und CAPN7, die nur in Ratte bzw. Maus identifiziert worden sind, sind nicht gezeigt. Die veröffentlichte CAPN6-Sequenz wurde nicht mit aufgenommen, da sie nur eine Teilsequenz ist. Die Alternativnamen und Zugangsnummern für die gruppierten Calpaine sind in der Legende von Fig. 2 angegeben.

FIG. 2. Wurzelloser phylogenetischer Stammbaum der Familie der großen Untereinheit menschlicher Calpaine. Die Analyse wurde mit dem PAUP-Programm durchgeführt, und der Stammbaum mit CLUSTREE vom HUSAR-Server des Deutschen Krebsforschungszentrums, Heidelberg (www.dkfz-heidelberg.de) angeordnet. Die Längen der horizontalen Linien sind proportional zu den abgeleiteten phylogenetischen Entfernungen; die vertikalen Linien haben keine Bedeutung. Es wurden 1000 Bootstrapping-Wiederholungen durchgeführt, und die Werte sind an den inneren Knoten gezeigt. Die CAPN7-Sequenz stammt von der Maus, da nur wenig menschliche Nukleotid- und Proteinsequenz verfügbar ist. Allerdings existiert das menschliche Orthologon (siehe Lit. 8), so daß die Verwendung der Maussequenz für diesen Vergleich gerechtfertigt ist. Die partielle menschliche CAPN8-Sequenz ist die vorhergesagte Translation des EST-Klons AA026030 (Hillier et al., 1995, The WashU-Merck EST-Projekt, unveröffentlichte Ergebnisse). Eine Aminosäuretranslation dieses Klons zeigt hohe Ähnlichkeit zur Ratten-CAPN8-Sequenz. Mit dieser Sequenz wurde kein Bootstrapping durchgeführt, da sie viel kürzer als die anderen ist. Somit kann der Bootstrapping-Wert nicht sinnvoll mit den Werten aus Vergleichen von Vollängen-Sequenzen verglichen werden. Es wird die vom Human Gene Nomenclature Committee spezifizierte Nomenklatur verwendet. Vorherige Namen für die verschiedenen Calpaine sind: CAPN1 - m-Calpain, CAPN2 - m-Calpain, CAPN3 - p94, nCl-1, CAPN8, nCL-2, CAPN9, nCL-4. Die EMBL-Zugangsnummern für die verwendeten Calpain-Sequenzen sind: CAPN1 (P17655), CAPN2 (P07384), CAPN3 (P20807), CAPN5 (Y10656), CAPN6 (Y12582), CAPN7 (AJ012475) und CAPN9 (AF022799).

Fig. 3. Expression von CAPN11. Eine ³²P-markierte DNA-Sonde mit einem 800-Basenpaar-Segment der codierenden Sequenz der menschlichen CAPN11-cDNA wurde an einen Master-Blot (A), einen Nylonfilter mit Dot-Blots von RNAs von 50 verschiedenen menschlichen Geweben oder einen Clontech-Mehrgewebe-Northern-Blot (D) hybridisiert. Die Filter wurden hochstringent (6x SSC, 65°C) gewaschen. Die genaue Stelle der verschiedenen RNAs auf dem Dot-Blot-Filter ist schematisch gezeigt (C). Die RNAs auf dem Northern-Blot sind über den entsprechenden Spuren angegeben. Dot-Blot- und Northern-Blot wurden mit DNA-Sonden für menschliches Ubiquitin (B) und b-Aktin rehybridisiert, um die Mengen der aufgetragenen Poly(A⁺)-RNA zu bestimmen. Für den Northern-Blot sind die Stellen der Größenmarker (in Kilobasen) angegeben. Die Expositionszeiten waren: A, 72 Std.; B, 24 Std.; D, 48 Std. PBL = Periphere Blut-Leukocyten.

Patentansprüche

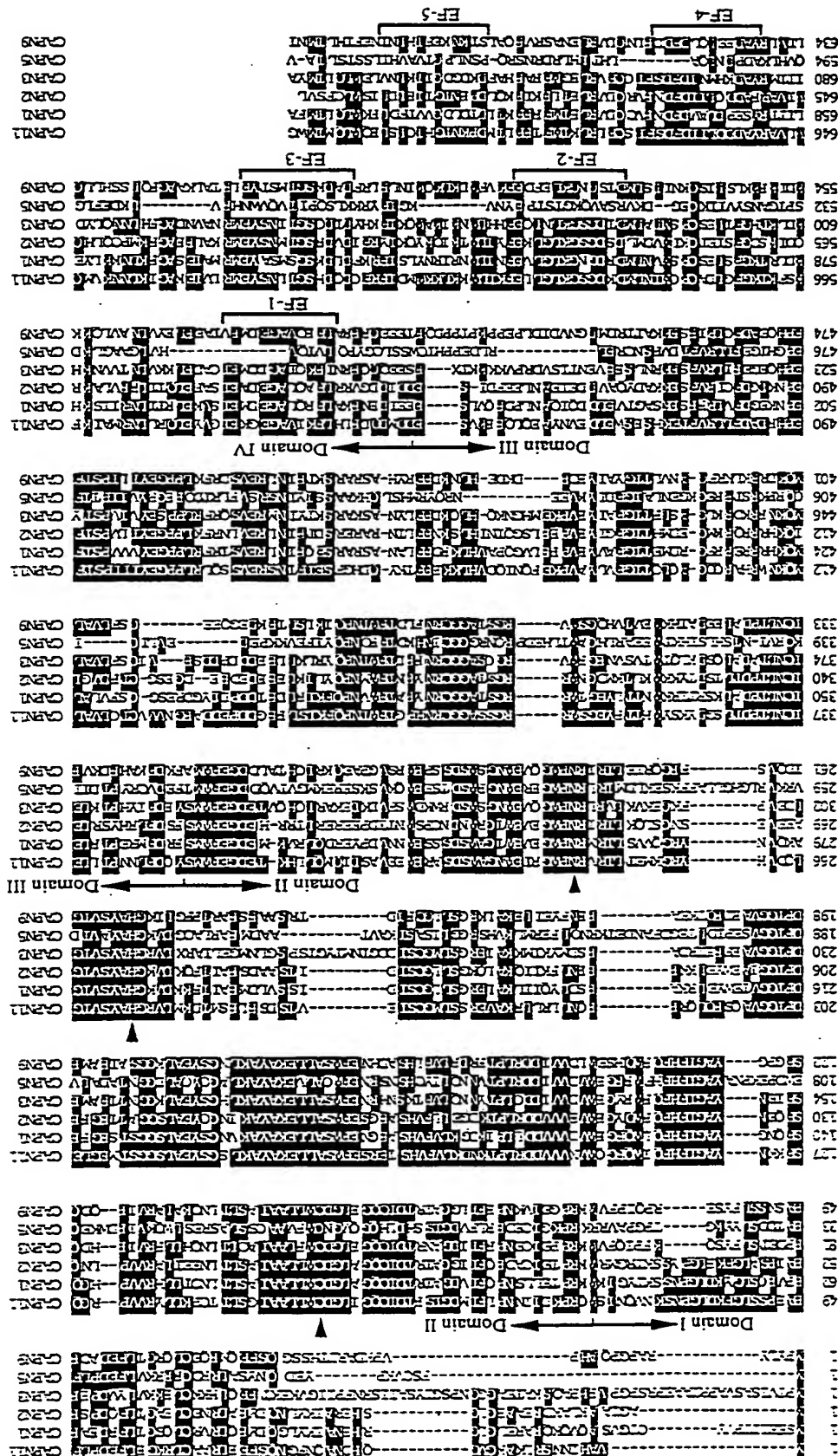
1. Polypeptid mit der Aminosäuresequenz SEQ.-ID.-Nr. 2.
5
2. Polynukleotidsequenz, die ein Polypeptid nach Anspruch 1 codiert.
3. Polynukleotidsequenz mit der Sequenz SEQ.-ID.-Nr. 1.
10
4. Verwendung eines Polypeptides nach Anspruch 1 zur Identifizierung von Substanzen, die die enzymatische Aktivität dieses Polypeptides hemmen können.
- 15 5. Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen, die die enzymatische Aktivität eines Polypeptides nach Anspruch 1 hemmen, umfassend:
 - 20 (a) das Vergleichen des Ausmaßes der enzymatischen Aktivität von CAPN11 in Gegenwart der Verbindung mit dem Ausmaß der enzymatischen Aktivität von CAPN11 in Abwesenheit der Verbindung und
 - 25 (b) das Auswählen von Verbindungen, die das Ausmaß der enzymatischen Aktivität von CAPN11 gegenüber der enzymatischen Aktivität von CAPN11 in Abwesenheit der Verbindung ändern.
- 30 6. Verwendung von Verbindungen, die durch das Verfahren nach Anspruch 5 identifiziert worden sind, zur Behandlung von Fruchtbarkeitsstörungen bei Männern.

35

40

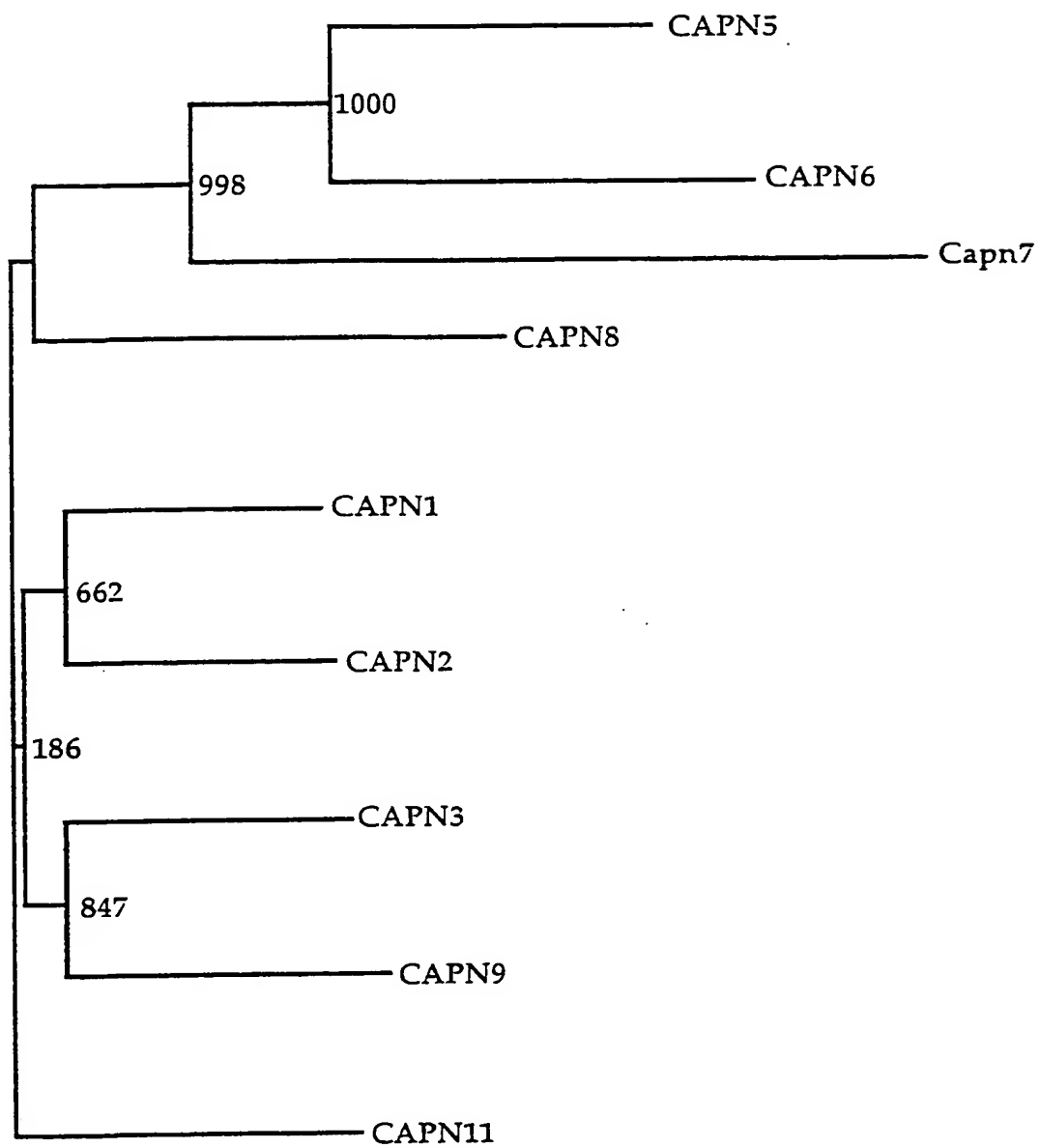
45

Fig. 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

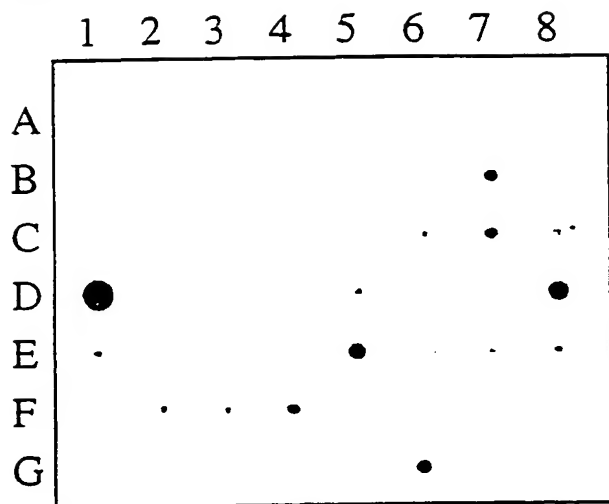
Fig. 2



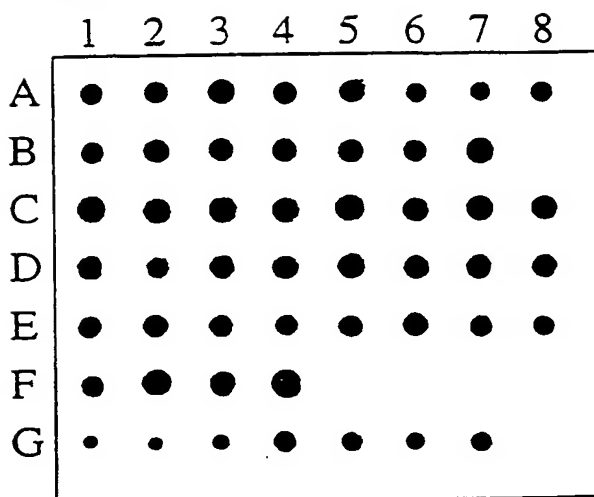
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 3

A.



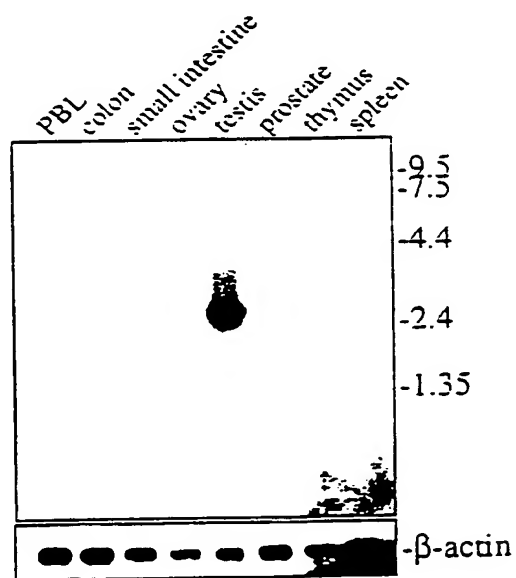
B.



C.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	whole brain	amygdala	caudate nucleus	cerebellum	cerebral cortex	frontal lobe	hippocampus	medulla oblongata
B	occipital lobe	putamen	substantia nigra	temporal lobe	thalamus	nucleus accumbens	spinal cord	
C	heart	liver	skeletal muscle	colon	bladder	stomach	prostate	stomach
D	ovary	ovary	pancreas	pituitary gland	adrenal gland	thyroid gland	salivary gland	mammary gland
E	kidney	liver	small intestine	spleen	thymus	peripheral leukocytes	lymph node	bone marrow
F	appendix	lung	trachea	placenta				
G	total brain	total heart	total kidney	total liver	total spleen	total thymus	total lung	

D.



THIS PAGE BLANK (USPTO)

1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Hoden-spezifisches Calpain

<120> Testis specific calpain

<130> OZ0050/

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> 5'UTR

<222> (1)..(103)

<220>

<221> CDS

<222> (104)..(2212)

<220>

<221> 3'UTR

<222> (2213)..(2338)

<400> 1

ctccccaggg ccgagtccttc cggagtcagc agagagcctg gatggatcac aggaggataa 60

gcctcggggc tcatgtgcgg agcccacttt tactgatacg gga atg gtg gct cac 115
Met Val Ala His

1

ata aac aac agc cgg ctc aag gcc aag ggc gtg ggc cag cac gac aac 163
Ile Asn Asn Ser Arg Leu Lys Ala Lys Gly Val Gly Gln His Asp Asn
5 10 15 20gcc cag aac ttt ggt aac cag agc ttt gag gag ctg cga gca gcc tgt 211
Ala Gln Asn Phe Gly Asn Gln Ser Phe Glu Glu Leu Arg Ala Ala Cys
25 30 35cta aga aag ggg gag ctc ttc gag gac ccc tta ttc cct gct gaa ccc 259
Leu Arg Lys Gly Glu Leu Phe Glu Asp Pro Leu Phe Pro Ala Glu Pro
40 45 50agc tca ctg ggc ttc aag gac ctg ggc ccc aac tcc aaa aat gtg cag 307
Ser Ser Leu Gly Phe Lys Asp Leu Gly Pro Asn Ser Lys Asn Val Gln
55 60 65aac atc tcc tgg cag cgg ccc aag gat atc ata aac aac cct cta ttc 355
Asn Ile Ser Trp Gln Arg Pro Lys Asp Ile Ile Asn Asn Pro Leu Phe

THIS PAGE BLANK (USPTO)

70	75	80	
atc atg gat ggg att tct cca aca gac atc tgc cag ggg atc ctc ggg Ile Met Asp Gly Ile Ser Pro Thr Asp Ile Cys Gln Gly Ile Leu Gly 85 90 95 100			403
gac tgc tgg ctg ctg gct gcc atc ggc tcc ctt acc acc tgc ccc aaa Asp Cys Trp Leu Leu Ala Ala Ile Gly Ser Leu Thr Thr Cys Pro Lys 105 110 115			451
ctg cta tac cgc gtg gtg ccc aga gga cag agc ttc aag aaa aac tat Leu Leu Tyr Arg Val Val Pro Arg Gly Gln Ser Phe Lys Lys Asn Tyr 120 125 130			499
gct ggc atc ttc cat ttt cag att tgg cag ttt gga cag tgg gtg aac Ala Gly Ile Phe His Phe Gln Ile Trp Gln Phe Gly Gln Trp Val Asn 135 140 145			547
gtg gtg gta gat gac cgg ctg ccc aca aag aat gac aag ctg gtg ttt Val Val Val Asp Asp Arg Leu Pro Thr Lys Asn Asp Lys Leu Val Phe 150 155 160			595
gtg cac tca acc gaa cgc agt gag ttc tgg agt gcc ctg ctg gag aag Val His Ser Thr Glu Arg Ser Glu Phe Trp Ser Ala Leu Leu Glu Lys 165 170 175 180			643
gcg tat gcc aag ctg agt ggg tcc tat gaa gca ttg tca ggg ggc agt Ala Tyr Ala Lys Leu Ser Gly Ser Tyr Glu Ala Leu Ser Gly Gly Ser 185 190 195			691
acc atg gag ggc ctt gag gac ttc aca gga ggc gtg gcc cag agc ttc Thr Met Glu Gly Leu Glu Asp Phe Thr Gly Gly Val Ala Gln Ser Phe 200 205 210			739
caa ctc cag agg ccc cct cag aac ctg ctc agg ctc ctt agg aag gcc Gln Leu Gln Arg Pro Pro Gln Asn Leu Leu Arg Leu Leu Arg Lys Ala 215 220 225			787
gtg gag cga tcc tcc ctc atg ggt tgc tcc att gaa gtc acc agt gat Val Glu Arg Ser Ser Leu Met Gly Cys Ser Ile Glu Val Thr Ser Asp 230 235 240			835
agt gaa ctg gaa tcc atg act gac aag atg ctg gtg aga ggg cac gct Ser Glu Leu Glu Ser Met Thr Asp Lys Met Leu Val Arg Gly His Ala 245 250 255 260			883
tac tct gtg act ggc ctt cag gat gtc cac tac aga ggc aaa atg gaa Tyr Ser Val Thr Gly Leu Gln Asp Val His Tyr Arg Gly Lys Met Glu 265 270 275			931
aca ctg att cgg gtc cgg aat ccc tgg ggc cgg att gag tgg aat gga Thr Leu Ile Arg Val Arg Asn Pro Trp Gly Arg Ile Glu Trp Asn Gly 280 285 290			979
gct tgg agt gac agt gcc agg gag tgg gaa gag gtg gcc tca gac atc Ala Trp Ser Asp Ser Ala Arg Glu Trp Glu Glu Val Ala Ser Asp Ile 295 300 305			1027
cag atg cag ctg ctg cac aag acg gag gac ggg gag ttc tgg atg tcc Gln Met Gln Leu Leu His Lys Thr Glu Asp Gly Glu Phe Trp Met Ser			1075

THIS PAGE BLANK (USPTO)

310	315	320	
tac caa gat ttc ctg aac aac ttc acg ctc ctg gag atc tgc aac ctc			1123
Tyr Gln Asp Phe Leu Asn Asn Phe Thr Leu Leu Glu Ile Cys Asn Leu			
325	330	335	340
acg cct gat aca ctc tct ggg gac tac aag agc tac tgg cac acc acc			1171
Thr Pro Asp Thr Leu Ser Gly Asp Tyr Lys Ser Tyr Trp His Thr Thr			
	345	350	355
ttc tac gag ggc agc tgg cgc aga ggc agc tcc gca ggg ggc tgc agg			1219
Phe Tyr Glu Gly Ser Trp Arg Arg Gly Ser Ser Ala Gly Gly Cys Arg			
	360	365	370
aac cac cct ggc acg ttc tgg acc aac ccc cag ttt aag atc tct ctt			1267
Asn His Pro Gly Thr Phe Trp Thr Asn Pro Gln Phe Lys Ile Ser Leu			
	375	380	385
cct gag ggg gat gac cca gag gat gac gca gag ggc aat gtt gtg gtc			1315
Pro Glu Gly Asp Asp Pro Glu Asp Asp Ala Glu Gly Asn Val Val Val			
	390	395	400
tgc acc tgc ctg gtg gcc cta atg cag aag aac tgg cgg cat gca cgg			1363
Cys Thr Cys Leu Val Ala Leu Met Gln Lys Asn Trp Arg His Ala Arg			
405	410	415	420
cag cag gga gcc cag ctg cag acc att ggc ttt gtc ctc tac gcg gtc			1411
Gln Gln Gly Ala Gln Leu Gln Thr Ile Gly Phe Val Leu Tyr Ala Val			
	425	430	435
cca aaa gag ttt cag aac att cag gat gtc cac ttg aag aag gaa ttc			1459
Pro Lys Glu Phe Gln Asn Ile Gln Asp Val His Leu Lys Lys Glu Phe			
	440	445	450
ttc acg aag tat cag gac cac ggc ttc tca gag atc ttc acc aac tca			1507
Phe Thr Lys Tyr Gln Asp His Gly Phe Ser Glu Ile Phe Thr Asn Ser			
	455	460	465
cgg gag gtg agc agc caa ctc cgg ctg cct ccg ggg gaa tat atc att			1555
Arg Glu Val Ser Ser Gln Leu Arg Leu Pro Pro Gly Glu Tyr Ile Ile			
	470	475	480
att ccc tcc acc ttt gag cca cac aga gat gct gac ttc ctg ctt cgg			1603
Ile Pro Ser Thr Phe Glu Pro His Arg Asp Ala Asp Phe Leu Leu Arg			
485	490	495	500
gtc ttc acc gag aag cac agc gag tca tgg gaa ttg gat gaa gtc aac			1651
Val Phe Thr Glu Lys His Ser Glu Ser Trp Glu Leu Asp Glu Val Asn			
	505	510	515
tat gct gag caa ctc caa gag gaa aag gtc tct gag gat gac atg gac			1699
Tyr Ala Glu Gln Leu Gln Glu Glu Lys Val Ser Glu Asp Asp Met Asp			
	520	525	530
cag gac ttc cta cat ttg ttt aag ata gtg gca gga gag ggc aag gag			1747
Gln Asp Phe Leu His Leu Phe Lys Ile Val Ala Gly Glu Gly Lys Glu			
	535	540	545
ata ggg gtg tat gag ctc cag agg ctg ctc aac agg atg gcc atc aaa			1795
Ile Gly Val Tyr Glu Leu Gln Arg Leu Leu Asn Arg Met Ala Ile Lys			

THIS PAGE BLANK (USPTO)

550	555	560	
ttc aaa agc ttc aag acc aag ggc ttt ggc ctg gat gct tgc cgc tgc			1843
Phe Lys Ser Phe Lys Thr Lys Gly Phe Gly Leu Asp Ala Cys Arg Cys			
565	570	575	580
atg atc aac ctc atg gat aaa gat ggc tct ggc aag ctg ggg ctt cta			1891
Met Ile Asn Leu Met Asp Lys Asp Gly Ser Gly Lys Leu Gly Leu Leu			
	585	590	595
gag ttc aag atc ctg tgg aaa aaa ctc aag aaa tgg atg gac atc ttc			1939
Glu Phe Lys Ile Leu Trp Lys Lys Leu Lys Lys Trp Met Asp Ile Phe			
	600	605	610
aga gag tgt gac cag gac cat tca ggc acc ttg aac tcc tat gag atg			1987
Arg Glu Cys Asp Gln Asp His Ser Gly Thr Leu Asn Ser Tyr Glu Met			
	615	620	625
cgc ctg gtt att gag aaa gca ggc atc aag ctg aac aac aag gta atg			2035
Arg Leu Val Ile Glu Lys Ala Gly Ile Lys Leu Asn Asn Lys Val Met			
	630	635	640
cag gtc ctg gtg gcc agg tat gca gat gat gac ctg atc ata gac ttt			2083
Gln Val Leu Val Ala Arg Tyr Ala Asp Asp Asp Leu Ile Ile Asp Phe			
	645	650	655
gac agc ttc atc agc tgt ttc ctg agg cta aag acc atg ttc aca ttc			2131
Asp Ser Phe Ile Ser Cys Phe Leu Arg Leu Lys Thr Met Phe Thr Phe			
	665	670	675
ttt cta acc atg gac ccc aag aat act ggc cat att tgc ttg agc ctg			2179
Phe Leu Thr Met Asp Pro Lys Asn Thr Gly His Ile Cys Leu Ser Leu			
	680	685	690
gaa cag tgg ctg cag atg acc atg tgg gga tag aggcgctgta ggagcctggt			2232
Glu Gln Trp Leu Gln Met Thr Met Trp Gly			
	695	700	
catctctacc agcagcagca gcagcgaggt tctagcccag gaggggtgggg tgcttcttgt			2292
agccctcagc tctccagtct ctgctgatga aatgggatcc aggtgg			2338

<210> 2

<211> 702

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Val	Ala	His	Ile	Asn	Asn	Ser	Arg	Leu	Lys	Ala	Lys	Gly	Val	Gly
1				5					10					15	

Gln	His	Asp	Asn	Ala	Gln	Asn	Phe	Gly	Asn	Gln	Ser	Phe	Glu	Glu	Leu
			20					25					30		

Arg	Ala	Ala	Cys	Leu	Arg	Lys	Gly	Glu	Leu	Phe	Glu	Asp	Pro	Leu	Phe
		35					40					45			

Pro	Ala	Glu	Pro	Ser	Ser	Leu	Gly	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Pro	Asn	Ser
	50					55					60				

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Lys Asn Val Gln Asn Ile Ser Trp Gln Arg Pro Lys Asp Ile Ile Asn
 65 70 75 80
 Asn Pro Leu Phe Ile Met Asp Gly Ile Ser Pro Thr Asp Ile Cys Gln
 85 90 95
 Gly Ile Leu Gly Asp Cys Trp Leu Leu Ala Ala Ile Gly Ser Leu Thr
 100 105 110
 Thr Cys Pro Lys Leu Leu Tyr Arg Val Val Pro Arg Gly Gln Ser Phe
 115 120 125
 Lys Lys Asn Tyr Ala Gly Ile Phe His Phe Gln Ile Trp Gln Phe Gly
 130 135 140
 Gln Trp Val Asn Val Val Val Asp Asp Arg Leu Pro Thr Lys Asn Asp
 145 150 155 160
 Lys Leu Val Phe Val His Ser Thr Glu Arg Ser Glu Phe Trp Ser Ala
 165 170 175
 Leu Leu Glu Lys Ala Tyr Ala Lys Leu Ser Gly Ser Tyr Glu Ala Leu
 180 185 190
 Ser Gly Gly Ser Thr Met Glu Gly Leu Glu Asp Phe Thr Gly Gly Val
 195 200 205
 Ala Gln Ser Phe Gln Leu Gln Arg Pro Pro Gln Asn Leu Leu Arg Leu
 210 215 220
 Leu Arg Lys Ala Val Glu Arg Ser Ser Leu Met Gly Cys Ser Ile Glu
 225 230 235 240
 Val Thr Ser Asp Ser Glu Leu Glu Ser Met Thr Asp Lys Met Leu Val
 245 250 255
 Arg Gly His Ala Tyr Ser Val Thr Gly Leu Gln Asp Val His Tyr Arg
 260 265 270
 Gly Lys Met Glu Thr Leu Ile Arg Val Arg Asn Pro Trp Gly Arg Ile
 275 280 285
 Glu Trp Asn Gly Ala Trp Ser Asp Ser Ala Arg Glu Trp Glu Glu Val
 290 295 300
 Ala Ser Asp Ile Gln Met Gln Leu Leu His Lys Thr Glu Asp Gly Glu
 305 310 315 320
 Phe Trp Met Ser Tyr Gln Asp Phe Leu Asn Asn Phe Thr Leu Leu Glu
 325 330 335
 Ile Cys Asn Leu Thr Pro Asp Thr Leu Ser Gly Asp Tyr Lys Ser Tyr
 340 345 350
 Trp His Thr Thr Phe Tyr Glu Gly Ser Trp Arg Arg Gly Ser Ser Ala
 355 360 365
 Gly Gly Cys Arg Asn His Pro Gly Thr Phe Trp Thr Asn Pro Gln Phe
 370 375 380

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Lys Ile Ser Leu Pro Glu Gly Asp Asp Pro Glu Asp Asp Ala Glu Gly
 385 390 395 400
 Asn Val Val Val Cys Thr Cys Leu Val Ala Leu Met Gln Lys Asn Trp
 405 410 415
 Arg His Ala Arg Gln Gln Gly Ala Gln Leu Gln Thr Ile Gly Phe Val
 420 425 430
 Leu Tyr Ala Val Pro Lys Glu Phe Gln Asn Ile Gln Asp Val His Leu
 435 440 445
 Lys Lys Glu Phe Phe Thr Lys Tyr Gln Asp His Gly Phe Ser Glu Ile
 450 455 460
 Phe Thr Asn Ser Arg Glu Val Ser Ser Gln Leu Arg Leu Pro Pro Gly
 465 470 475 480
 Glu Tyr Ile Ile Ile Pro Ser Thr Phe Glu Pro His Arg Asp Ala Asp
 485 490 495
 Phe Leu Leu Arg Val Phe Thr Glu Lys His Ser Glu Ser Trp Glu Leu
 500 505 510
 Asp Glu Val Asn Tyr Ala Glu Gln Leu Gln Glu Glu Lys Val Ser Glu
 515 520 525
 Asp Asp Met Asp Gln Asp Phe Leu His Leu Phe Lys Ile Val Ala Gly
 530 535 540
 Glu Gly Lys Glu Ile Gly Val Tyr Glu Leu Gln Arg Leu Leu Asn Arg
 545 550 555 560
 Met Ala Ile Lys Phe Lys Ser Phe Lys Thr Lys Gly Phe Gly Leu Asp
 565 570 575
 Ala Cys Arg Cys Met Ile Asn Leu Met Asp Lys Asp Gly Ser Gly Lys
 580 585 590
 Leu Gly Leu Leu Glu Phe Lys Ile Leu Trp Lys Lys Leu Lys Lys Trp
 595 600 605
 Met Asp Ile Phe Arg Glu Cys Asp Gln Asp His Ser Gly Thr Leu Asn
 610 615 620
 Ser Tyr Glu Met Arg Leu Val Ile Glu Lys Ala Gly Ile Lys Leu Asn
 625 630 635 640
 Asn Lys Val Met Gln Val Leu Val Ala Arg Tyr Ala Asp Asp Asp Leu
 645 650 655
 Ile Ile Asp Phe Asp Ser Phe Ile Ser Cys Phe Leu Arg Leu Lys Thr
 660 665 670
 Met Phe Thr Phe Phe Leu Thr Met Asp Pro Lys Asn Thr Gly His Ile
 675 680 685
 Cys Leu Ser Leu Glu Gln Trp Leu Gln Met Thr Met Trp Gly
 690 695 700

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
28. Dezember 2000 (28.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/78933 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 15/57**,
9/64, C12Q 1/37

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/05261**

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. Juni 2000 (07.06.2000)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
199 28 021.5 18. Juni 1999 (18.06.1999) **DE**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];**
D-67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **DEAR, Neil, T.**
[AU/DE]; Wundstrasse 31, D-69123 Heidelberg (DE).
BÖHM, Thomas [DE/DE]; Freiburgerstrasse 30, D-79279
Vörstetten (DE). **MÖLLER, Achim [DE/DE];** Im Zaun-
rücken 10, D-67269 Grünstadt (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **BASF AKTIENGE-
SELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).**

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 26. Juli 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **NOVEL CALPAINS AND THEIR USE**

(54) Bezeichnung: **NEUE CALPAINE UND DEREN VERWENDUNG**

(57) Abstract: The invention relates to a novel mammalian calpain CAPN11, to the synthesis and to the use thereof.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein neues Säugetier-Calpain CAPN11, seine Synthese sowie seine Verwendung.

WO 00/78933 A3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No

PCT/EP 00/05261

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/57 C12N9/64 C12Q1/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 197 37 105 A (BASF AG) 4 March 1999 (1999-03-04) the whole document	
A	ZHANG WENLI ET AL: "The major calpain isozymes are long-lived proteins. Design of an antisense strategy for calpain depletion in cultured cells." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 31, 1996, pages 18825-18830, XP002159273 ISSN: 0021-9258 the whole document	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 February 2001

Date of mailing of the international search report

21/02/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Smalt, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/05261

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	DEAR T NEIL ET AL: "CAPN11: A calpain with high mRNA levels in testis and located on chromosome 6." GENOMICS, vol. 59, no. 2, 15 July 1999 (1999-07-15), pages 243-247, XP002159274 ISSN: 0888-7543 the whole document -----	1-3
E	WO 00 58473 A (CURAGEN CORP ; LEACH MARTIN (US); SHIMKETS RICHARD A (US)) 5 October 2000 (2000-10-05) * Seq.ID.930, identifiziert als menschliche Calpaine (ORF465), hatt nur eine Substitution (G655D) im Vergleich zu Seq.ID.2 der vorliegenden Anmeldung. Siehe auch Seq.ID.929. * page 43, line 24 -page 44, line 21; claims 18,20-22 page 128, line 465 page 926 -page 929 -----	5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/05261

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19737105 A	04-03-1999	AU 9263598 A	16-03-1999
		BR 9811365 A	22-08-2000
		CN 1277634 T	20-12-2000
		WO 9910480 A	04-03-1999
		EP 1009811 A	21-06-2000
		NO 20000961 A	14-04-2000
WO 0058473 A	05-10-2000	NONE	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05261

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/57 C12N9/64 C12Q1/37

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 197 37 105 A (BASF AG) 4. März 1999 (1999-03-04) das ganze Dokument	
A	--- ZHANG WENLI ET AL: "The major calpain isozymes are long-lived proteins. Design of an antisense strategy for calpain depletion in cultured cells." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 271, Nr. 31, 1996, Seiten 18825-18830, XP002159273 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument	
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. Februar 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

21/02/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Smalt, R

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int ionalales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05261

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>DEAR T NEIL ET AL: "CAPN11: A calpain with high mRNA levels in testis and located on chromosome 6."</p> <p>GENOMICS, Bd. 59, Nr. 2, 15. Juli 1999 (1999-07-15), Seiten 243-247, XP002159274 ISSN: 0888-7543 das ganze Dokument</p>	1-3
E	<p>WO 00 58473 A (CURAGEN CORP ;LEACH MARTIN (US); SHIMKETS RICHARD A (US)) 5. Oktober 2000 (2000-10-05) Seq.ID.930, identified as human calpain (ORF465) has only one substitution (G655D) as compared to Seq.ID.2 of the present application. See also Seq.ID.929 Seite 43, Zeile 24 -Seite 44, Zeile 21; Ansprüche 18,20-22 Seite 128, Zeile 465 Seite 926 -Seite 929</p>	5

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Int. .ionales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05261

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19737105 A	04-03-1999	AU 9263598 A	16-03-1999
		BR 9811365 A	22-08-2000
		CN 1277634 T	20-12-2000
		WO 9910480 A	04-03-1999
		EP 1009811 A	21-06-2000
		NO 20000961 A	14-04-2000
WO 0058473 A	05-10-2000	KEINE	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO).